

Ensayo biológico que establece la actividad enzimática de la favina y su efecto sobre la actividad de la pepsina en pollos de engorde.

La digestión enzimática se realizó a 37°C en pollos de engorde con una dieta que contenía 10% de habas y 10% de favina al 100% en forma similar al estómago, diluyendo el pH a 1,9 con HCl. A dicha dieta se le adicionó 0,05% de pepsina y se realizó la digestión a 37°C.

Contribución al estudio de la calidad protéica del haba (Vicia Faba)*

A. COY, J. MORENO, V. M. DE GOMEZ**

y A.S. BERMUDEZ***

RESUMEN

Con el objeto de establecer si la hemaglutinina del haba (Vicia Faba), llamada favina, es la responsable del bajo valor nutricional de dicha leguminosa se estudió "in vitro" el efecto de la pepsina sobre su actividad hemaglutinante. Los resultados mostraron que la digestión enzimática, en condiciones similares a las del estómago (pH 1,9 y $t = 37^{\circ}\text{C}$), es suficiente para inhibir la actividad hemaglutinante de la favina; lo cual sugiere que esta no es la causa de la baja calidad protéica del haba, ya que esta inactivación impide la interacción entre las células epiteliales del intestino y la lectina.

El ensayo biológico realizado con pollos de engorde, mostró que la utilización neta de proteína (NPU) del haba es sólo del 56% comparada contra la dieta patrón. Esta baja utilización se atribuye a la deficiencia de aminoácidos azufrados de la leguminosa, ya que la suplementación con 0,7% de L Metionina incrementa el NPU del haba a un valor estadísticamente similar al de la dieta patrón.

ABSTRACT

In order to establish the relationship between the content of favin and the nutritional value of faba beans (Vicia Faba), it was studied the action of pepsin over the hemagglutinin activity. It was found, that the enzymatic digestion realized in similar conditions to that of the stomach (pH 1,9 $t = 37^{\circ}\text{C}$) was enough to inhibit the hemagglutinin activity of the lectin. These findings suggest that the favin is not related to the low protein quality of the faba beans.

* Trabajo realizado en el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, como parte del proyecto de investigación: "Interacción Favina - Carbohidrato", con la financiación de COLCIENCIAS y el CINDEC.

** Química, Dr. Sc., Profesor Asistente, Departamento de Química, Universidad Nacional.

*** Química, M. Sc., Profesor Asistente Departamento de Química, Universidad Nacional.

A NPU assay was carried out to assess the protein quality of these faba beans. There was a marked difference in growth response between the chicks fed beans with and without L-Methionine supplementation.

INTRODUCCION

Las leguminosas presentan un bajo valor nutricional que se asocia al contenido de factores antinutricionales termolábiles como: inhibidores de tripsina y hemaglutininas o a una deficiencia de aminoácidos azufrados (1, 2, 3).

El haba (*Vicia Faba*), es una leguminosa de fácil cultivo en tierras de clima frío, que a pesar de poseer un alto valor de energía metabolizable (2.900 cal/g) y de proteína bruta (20 – 30%) presenta una baja utilización por los animales experimentales (4,5).

Los estudios realizados hasta el momento, muestran resultados contradictorios en cuanto a la causa de esta baja utilización del alimento: algunos investigadores la atribuyen a la deficiencia de aminoácidos azufrados (6), mientras otros consideran que es debida a la presencia de la favina (7).

Este trabajo se planeó con el objeto de estudiar "in vitro": el efecto de las condiciones fisiológicas del estómago sobre la actividad hemaglutinante de la favina y por lo tanto su relación con la calidad protéica de la leguminosa, determinada por análisis químicos y biológicos.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Material de Ensayo

Se utilizó haba blanca, sin clasificar.

2.2. Actividad Hemaglutinante

Los extractos para los ensayos de hemaglutinación se prepararon agregando 1 gramo de la muestra molida a 5 mililitros de solución acuosa de NaCl al 1%. La suspensión fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se centrifugó por 10 minutos. El líquido sobrenadante se utilizó para los ensayos.

El método empleado para este análisis, se basa en la técnica fotométrica de Liener y Hill (8) modificada por Marquardt *et al.* (9), utilizando una suspensión patrón de eritrocitos humanos en lugar de la suspensión de eritrocitos tripsinizados de conejo.

Una unidad de actividad hemaglutinante (UH) es definido como la cantidad de material que se requiere para que el 50% de la suspensión patrón de eritrocitos se sedimente.

2.3. Efecto de la pepsina sobre la actividad hemaglutinante de la Favina.

La digestión enzimática se realizó a 37°C empleando un extracto de favina obtenido en forma similar al descrito en el paso anterior y bajando el pH a 1,9 con HCl. A dicho extracto se le adicionó pepsina con una actividad equivalente de 1:10000, en una relación proteína/enzima de 100:1.

Una vez iniciado el proceso se tomaron alícuotas del extracto cada 30 minutos a los cuales se les agregó inmediatamente buffer de fosfatos, para elevar el pH hasta 6,5 e inhibir en esta forma la digestión y determinar a continuación la actividad hemaglutinante.

La digestión enzimática se comparó contra una digestión ácida a pH 1,9 y otra a pH neutro.

2.4. Análisis de Aminoácidos

La muestra fue analizada en el Instituto de Investigaciones Tecnológicas, mediante una técnica de cromatografía de gases que permite cuantificar 12 aminoácidos y por métodos espectrofotométricos para determinar triptófano (10) y lisina disponible (11).

Tabla No. 1

COMPOSICIÓN DE DIETAS

Dieta composición: minutos de tratamiento	Dieta 1 basal Patrón	Dieta 2 libre de Proteína	Dieta 3 harina de haba Metionina*	Dieta 4 harina de haba cruda
Sorgo	82.10	—	—	—
Torta de Soya	5,00	—	—	—
H. de pescado	5,10	—	—	—
H. de haba	—	—	64,68	64,68
Afrecho de cebada	—	—	—	—
Fosfato bicálcico	1,50	2,60	2,05	2,05
Carbonato de calcio	1,35	1,50	1,50	1,50
Sal (NaCl)	0,25	0,30	0,30	0,30
Prémezcla: Vit. y minerales	0,10	0,10	0,10	0,10
L-Lisina	0,70	—	0,18	—
L-Metionina	0,27	—	0,71	—
Celulosa	3,62	4,00	3,00	3,00
Azúcar	—	57,50	10,00	10,00
Almidón de maíz	—	30,00	17,00	18,37
Aceite de maíz	—	4,00	0,45	—

2.5. Ensayo biológico

El análisis biológico se desarrolló en el Centro de Investigaciones Agropecuarias, ICA, Tibaitatá.

Este ensayo se realizó con pollos de engorde sin sexar, raza Hubbard, empleando la técnica de Fisher (12) para calcular la utilización neta de proteína (NPU).

La composición de las dietas experimentales suministradas a las aves aparece en la Tabla No. 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de la actividad hemaglutinante de la harina de haba.

La baja actividad hemaglutinante de los extractos de harina de haba en presencia de la suspensión patrón de eritrocitos humanos (0.1%), indica la existencia de interferencias, probablemente azúcares tales como la glucosa. (Ver Tabla No. 2).

Por dicha razón los extractos fueron dializados contra una solución de NaCl al 1% hasta fin de carbohidratos. Los resultados, que aparecen en la Tabla No. 2, muestran que la actividad hemaglutinante es un 60% mayor en los extractos dializados que en los sin dializar.

Tabla No. 2

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE EN LA HARINA DE HABA

Extracto	Suspensión patrón de eritrocitos	Temperatura	Tratamiento	UH/mg PROT.
Sin dializar	0,1%	Ambiente	Ninguno	105
Dializado	0,1%	Ambiente	Ninguno	175
Sin dializar	1,0%	Ambiente	Ninguno	305

UH – Unidades de Actividad Hemaglutinante

Sin embargo, para fines prácticos, el dializado de los extractos no es aconsejable, ya que lo que se trata es de simular "in vitro", lo que ocurre a nivel fisiológico, donde la presencia de azúcares es inevitable en los productos de digestión. Teniendo en cuenta que la interacción

favina-eritrocitos es del tipo antígeno —anticuerpo—, o sea que depende de la concentración relativa de los dos (Antígeno y anticuerpo), se decidió utilizar una suspensión de eritrocitos de mayor concentración (1%), con el fin de incrementar la actividad hemaglutinante en los extractos sin dializar.

Para la determinación de las unidades de actividad hemaglutinante de la favina, las soluciones se diluyeron inmediatamente antes de la lectura de tal forma que la suspensión patrón de eritrocitos presentará una absorbancia de 0,5 a 620 nm.

Con esta modificación se logró incrementar la interacción favina-eritrocitos en un 250% (Ver Tabla No. 2), por lo cual fue empleada en el estudio del efecto de la digestión ácida y enzimática.

3.2. Efecto de la digestión con pepsina sobre la actividad hemaglutinante de la favina

Los resultados registrados en la Tabla No. 3, muestran que la actividad hemaglutinante de la favina se reduce a sólo un 12% después de 30 minutos de digestión ácida (pH 1,9) a 37°C, comparada contra un blanco de digestión a la misma temperatura. Este efecto se acentúa con el tiempo, siendo la actividad hemaglutinante de la favina completamente nula a los 60 minutos de digestión.

El efecto de la digestión con pepsina, es más acentuado que el del pH solo, ya que no se detecta actividad hemaglutinante después de 30 minutos de tratamiento. Esta disminución puede deberse a la presencia de productos de hidrólisis de la harina de haba que interfieren en la interacción lectina-eritrocito y a una variación de la estructura de la hemaglutinina que modifica sus propiedades.

Tabla No. 3

EFECTO DE LA PEPSINA SOBRE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA FAVINA

Digestión	Temperatura	Tiempo	Suspensión de eritrocitos	UH / mg PROT.
Ninguna	37 °C	30'	1,0 %	280
Ninguna	37 °C	60'	1,0 %	280
Acida (pH 1,9)	37 °C	30'	1,0 %	35
Acida (pH 1,9)	37 °C	60'	1,0 %	0
Enzimática (Pepsina, pH 1,9)	37 °C	30'	1,0 %	0
Enzimática (Pepsina pH 1,9)	37 °C	60'	1,0 %	0

Estos resultados indican que la baja calidad de la proteína del haba, no se debe a la presencia de la favina, ya que la digestión que sufre el alimento mientras permanece en el estómago, libera azúcares que interfieren con la actividad de la lectina y modifican su estructura de tal forma que no se produzca una interacción con las células epiteliales del intestino.

3.3. Análisis de Aminoácidos

Los resultados del análisis de aminoácidos de la proteína del haba aparecen en la Tabla No. 4. Estos valores comparados con el requerimiento de los pollos en crecimiento (13), indican que esta leguminosa es deficiente en metionina y solo suministra un 35% de la cantidad requerida por estos animales para su normal desarrollo.

Tabla No. 4

Contenido de aminoácidos (Vicia Faba) g/ 100 g. de Proteína	Requerimiento del pollo (13) g / 100 g. de proteína
Alanina	4,4
Acido Aspartico	11,6
Metionina	0,7
Acido Glutámico	14,8
Glicina	4,3
Isoleucina	4,8
Leucina	8,0
Lisina disponible	6,0
Fenilalanina	5,0
Prolina	4,2
Serina	6,1
Treonina	4,0
Valina	5,4
Triptofano	0,9

3.4. Ensayo Biológico

El análisis biológico de la calidad protéica de la harina de haba, determinada como utilización neta de proteína (NPU), confirma los resultados encontrados "in vitro".

Los valores de NPU para la harina de haba (Ver Tabla No. 5), muestran que su utilización es sólo del 56% comparada contra una dieta patrón. Este bajo valor se debe a la deficiencia de aminoácidos azufrados, ya que una suplementación de la dieta con un 0.7% de L-metionina, incrementa la utilización de la proteína del haba hasta un valor estadísticamente similar al de la dieta patrón.

Tabla No. 5

UTILIZACION NETA DE PROTEINA

Dieta	NPU°
Patrón	43 ± 3
Harina de Haba	24 ± 3
Harina de Haba + 0,7 L-metionina	42 ± 1

° Valores promedio para cuatro repeticiones más o menos desviación estandar.

Por lo tanto, se puede afirmar que la baja calidad protéica del haba no es debida al contenido de favina, sino al bajo aporte de aminoácidos azufrados.

BIBLIOGRAFIA

SUMMARY

1. D.J. EVANS, and S.L. BANDEMER, "Nutritive Value of Legume Seed Proteins", *J. Agric. Food*, **15**: 439, 1967.
2. I.E. LIENER, "Effects of Antinutritional and Toxic Factors on the Quality and Utilization of Legume Proteins", *J. Clin. Nut.*, **1**: 523, 1975.
3. I.E. LIENER, "Phytohemagglutinins: Their Nutritional Significance", *J. Agric. Food Chem.*, **22**: 17, 1974.
4. A.S. BERMUDEZ, V.M. de GOMEZ y M. RENDON, "Estudio de la calidad protéica y del contenido de Energía Metabolizable del Haba (*Vicia Faba*)", *Rev. Col. Quimc.*, **7**: 27, 1977.
5. R.S. BHATTY, "Trypsin Inhibitors of Faba Beans (*Vicia Faba*) Preliminary Studies", *Can J. Bot.*, **53**: 3075, 1975.

6. R.R. MARQUARDT and L.D. CAMPBELL, "Deficiency of Methionine in Raw and Autoclaved Faba Beans in Chick Diets", *Can. J. Anim. Sci.*, **54**: 537, 1974.
7. A.I. BENDER, Comunicación Personal, 1980.
8. I.E. LIENER and E.G. HILL, "The Photometric Determination of the Hemagglutinin Activity of Soyin and Crude Soybean Extracts", *Arch Biochem*, **54**: 223, 1955.
9. R.R. MARQUARDT, et al "Amino acid, Hemagglutinin and Trypsin Inhibitor levels, and Proximate Analyses of Faba Beans (*Vicia Faba L. var. minor*) and faba beans fractions", *Can. J. Anim. Sci.*, **55**: 421, 1975.
10. J.R. SPIES and D. CHAMBERS, "Determination of Tryptophan in Proteins". *Anal. Chem.* **39**: 1412, 1967.
11. J.F. CONKERTON and V.L. FRAMPTON, "Reaction of Gossypol with Free E-amino groups of Lysine in Proteins", *Arch. Biochem and Biophys.*, **81**: 130, 1959.
12. H. FISHER, in: "Proteins in Human Nutrition" editado por J. Porter and A. Rolls, Academic Press, London, 1973.
13. M. SCOTT, M. NESHEIM and R. YOUNG, R: "Alimentación de las aves". GEA Barcelona, 1973.